

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 24520071152531

UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

脑靶向载替莫唑胺聚氰基丙烯酸正丁酯纳  
米粒的实验研究

Studies on Brain Targeted Temozolomide  
Polybutylcyanoacrylate Nanoparticles

林晓宁

指导教师姓名: 田新华 教授

专 业 名 称: 外科学(神经外科学)

论文提交日期: 2010 年 5 月

论文答辩时间: 2010 年 6 月

学位授予日期: 2010 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2010 年 5 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

# 目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
前 言.....	1
第一章 载替莫唑胺聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒制备工艺初选研究.....	6
1.1 引言.....	6
1.2 实验材料和仪器 .....	7
1.3 实验方法 .....	8
1.4 结果与讨论 .....	12
1.5 本章小结 .....	22
第二章 载替莫唑胺聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒体外释药行为研究 ....	24
2.1 引言.....	24
2.2 实验材料和仪器 .....	24
2.3 实验方法 .....	25
2.4 结果与讨论 .....	27
2.5 本章小结 .....	33
第三章 载替莫唑胺聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒大鼠体内分布实验	
研究.....	34
3.1 引言.....	34
3.2 实验材料与仪器 .....	34
3.3 实验方法 .....	35
3.4 结果与讨论 .....	37
3.5 本章小结 .....	42
全文总结 .....	43
参考文献.....	44
综述 .....	49
硕士期间发表论文情况.....	55
致 谢 .....	56

## Contents

<b>Abstract in Chinese.....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract in English.....</b>	<b>II</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapter 1 Formulation optimization and preparation of</b>	
<b>TMZ-PBCA-NP.....</b>	<b>6</b>
1.1 Introduction.....	6
1.2 Materials and Instruments.....	7
1.3 Experimental.....	8
1.4 Results and Discussion.....	12
1.5 Conclusions.....	22
<b>Chapter 2 Studies on drug release behavior of TMZ-PBCA-NP in</b>	
<b>vitro.....</b>	<b>24</b>
2.1 Introduction.....	24
2.2 Materials and Instruments.....	24
2.3 Experimental.....	25
2.4 Results and Discussion.....	27
2.5 Conclusions.....	33
<b>Chapter 3 Studies on tissue distribution of TMZ-PBCA-NP in rat...34</b>	
3.1 Introduction.....	34
3.2 Materials and Instruments.....	34
3.3 Experimental.....	35
3.4 Results and Discussion.....	37
3.5 Conclusions.....	42
<b>Conclusions.....</b>	<b>43</b>
<b>References.....</b>	<b>44</b>

**Review.....49**

**Papers.....55**

**Acknowledgements.....56**

厦门大学博士论文摘要库

## 摘要

**目的：**优化工艺制备载替莫唑胺聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒（TMZ-PBCA-NP），并对其加以吐温-80 修饰，考察其体外释药行为特点及大鼠体内组织分布特性。

**方法：**首先分别采用界面聚合法和乳化聚合法制备 TMZ-PBCA-NP，单因素筛选结合正交试验优化 TMZ-PBCA-NP 的制备工艺，并根据纳米粒粒径、电位、包封率和载药量等理化性质对两种方法制备的 TMZ-PBCA-NP 进行评价比较，确定最佳的制备方法和工艺；采用动态膜透析法对 TMZ 原料药、最佳制备工艺研制的 TMZ-PBCA-NP 及经吐温-80 修饰的 TMZ-PBCA-NP 体外释药行为进行研究；最后以 Wistar 大鼠为研究对象，通过比较 TMZ 原料药、TMZ-PBCA-NP 和吐温-80 修饰的 TMZ-PBCA-NP 在体内心、肝、脾、肺、肾、脑的分布情况，验证载药纳米粒靶向入脑的能力。

**结果：**界面聚合法制备的 TMZ-PBCA-NP 呈椭圆形或类圆形，大小相对均匀，纳米粒子量少分散性好，平均粒径  $175.4 \pm 10.2 \text{ nm}$ ，PDI 0.21，表面电位  $-18.3 \pm 3.6 \text{ mV}$ ，包封率  $44.35 \pm 2.58\%$ ，载药量  $2.31 \pm 0.47\%$ ；乳化聚合法制备的 TMZ-PBCA-NP 载药纳米粒呈圆形，形态均匀，纳米颗粒量多且分散性佳，平均粒径  $135.8 \pm 11.3 \text{ nm}$ ，PDI 0.19，表面电位  $-24.8 \pm 2.2 \text{ mV}$ ，包封率  $44.23 \pm 2.04\%$ ，载药量  $2.80 \pm 0.05\%$ 。80% 的 TMZ 在 1h 后从 TMZ 溶液中释放出来，而 TMZ-PBCA-NP 和吐温-80 修饰的 TMZ-PBCA-NP 在 24h 内总累积释放率分别为  $66.03 \pm 1.61\%$  和  $62.97 \pm 1.40\%$ ，两种载药纳米粒的体外释药规律均符合 Ritger-Peppas 方程。经大鼠尾静脉注射给药 1 小时后，载药纳米粒，特别是经吐温-80 修饰的 TMZ-PBCA-NP，可显著提高大鼠脑内药物含量达 2.29 倍，同时显著降低 TMZ 在心、肾部位的含量。

**结论：**乳化聚合法制备 TMZ-PBCA-NP 效果优于界面聚合法；体外释药显示载药纳米粒相比于 TMZ 原料药，在体外具有明显缓释释药能力，其释药机制主要是 Fickian 扩散；体内分布情况表明经吐温-80 修饰的 TMZ-PBCA-NP 在体内具有良好的脑靶向性，对提高 TMZ 的疗效，降低心、肾毒副作用有一定的意义。

**关键词：**替莫唑胺；纳米粒；脑靶向性

## Abstract

**Objective:** To prepare temozolomide polybutylecyanoacrylate nanoparticles (TMZ-PBCA-NP) with optimized process and the surface of nanoparticles was modified with tween-80, and then to evaluate the release characteristics of temozolomide in vitro and the effects of tissue distribution in rat.

**Methods:** TMZ-PBCA-NP was prepared by emulsion polymerization and interfacial polymerization methods separately, one way experiment and orthogonal experiment were used to optimize the methods and preparation condition. Then the size, zeta potential, encapsulation ratio and drug loading of the TMZ-PBCA-NP were evaluated to choose the better preparation method. The in vitro drug release behavior of the TMZ solution, TMZ-PBCA-NP and TMZ-PBCA-NP coated with tween-80 was studied by using a dialysis bag diffusion technique. In order to evaluate the brain targeting ability of drug loaded nanoparticles, Wistar rats were used for body distribution studies of the TMZ solution, TMZ-PBCA-NP and TMZ-PBCA-NP coated with tween-80.

**Results:** TMZ-PBCA-NP prepared by the optimized interfacial polymerization method was ellipsoidal or spherical in shape and had a rather uniform size distribution. The quantity of nanoparticles was not much but with good dispersion, the average size of the TMZ-PBCA-NP was about  $175.4 \pm 10.2 \text{ nm}$  with PDI 0.21 and the zeta potential was  $-18.3 \pm 3.6 \text{ mV}$ . The encapsulation ratio and drug loading were  $44.35 \pm 2.58\%$  and  $2.31 \pm 0.47\%$ , respectively. While the TMZ-PBCA-NP prepared by the optimized emulsion polymerization method was spherical in shape and had a better uniform size distribution. The quantity of nanoparticles was much and the nanoparticles were dispersed well, the average size of the TMZ-PBCA-NP was about  $135.8 \pm 11.3 \text{ nm}$  with PDI 0.19 and the zeta potential was  $-24.8 \pm 2.2 \text{ mV}$ . The encapsulation ratio and drug loading were  $44.23 \pm 2.04\%$  and  $2.80 \pm 0.05\%$ , respectively. Approximately 80% of temozolomide had been released from TMZ solution after 1 h, however, by 24h the total cumulative releases from TMZ-PBCA-NP and TMZ-PBCA-NP coated with



polysorbate-80 were  $66.03 \pm 1.61\%$  and  $62.97 \pm 1.40\%$ , respectively. And both drug loaded nanoparticles were fitted to Ritger-Peppas equations. After 1 h of post injection into the tail vein, both types of nanoparticles, especially nanoparticles coated with polysorbate-80, significantly increased the accumulation of the drug by 2.29-fold in brain when compared with TMZ solution. While at the same time, the drug concentrations with nanoparticles were significantly lower in heart and kidney than in the TMZ solution.

**Conclusion:** The emulsion polymerization method is better than interfacial polymerization method in preparing TMZ-PBCA-NP. Compared to the TMZ solution, the TMZ-PBCA-NP and TMZ-PBCA-NP coated with tween-80 show apparent sustained release effect by the study of in vitro drug release, and the mechanism of drug release from PBCA nanoparticles would be Fickian diffusion. The in vivo results indicated that TMZ-PBCA-NP coated with tween-80 have a good targeting efficiency in brain, and it may decrease the TMZ side effects in heart and kidney and improve its treatment efficacy in brain.

**Key words:** temozolomide; nanoparticles; brain targeting

厦门大学博硕士论文摘要库

## 前言

脑胶质瘤占中枢神经系统肿瘤的 44.6%，是神经外科中难治性疾病之一[1]。近 30 年来，恶性胶质细胞瘤的治疗效果未能得到明显改善。由于其呈浸润性生长，与正常脑组织分界不清，手术不可能彻底切除，术后常有复发，单纯手术治疗平均生存期仅 6 个月，而手术后辅以放疗平均生存期不超过一年[2]。而且有些深部肿瘤不适合外科手术治疗，因此，化学药物治疗已成为恶性脑胶质瘤综合治疗的重要环节，但因血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的存在，使多数化疗药物常规静脉给药难以透过 BBB，无法在颅内达到足够浓度，而加大给药量又会导致全身毒副作用的增加。BBB 是由毛细血管的内皮细胞、基膜和胶质细胞的足突组成的，而各血管内皮细胞间又靠紧密连接偶联在一起，它的作用是维持神经元内环境的稳定性并有效地保护脑组织，它在选择性的使部分分子量相对小或者脂溶性好的物质透过的同时，又严格限制亲水性化合物、大分子物质以及带电荷物质进入脑内[3]。BBB 阻挡了 98%的小分子药物及 100%大分子药物进入脑部[4, 5]，影响了疾病的治疗效果，因此药物如何高效透过 BBB 一直是一个棘手的问题。

在过去的几十年里，为使药物能够有效克服 BBB 障碍进入脑内，大量的研究方法被探索。这些方法包括：直接注射药物入脑[6]、渗透性开放紧密连接[7]、药物结构性修饰[8]、化学药物投递系统[9]和纳米药物载体等。其中纳米药物载体常见的有脂质体[10]、固态脂质纳米粒[11]及聚合物纳米粒[12]，而聚合物纳米粒又是近年来被认为最具发展前景的中枢神经系统药物载体系统之一。

聚合物纳米粒是二十世纪八十年代兴起的一种新型的药物载体，可由天然材料或人工合成材料制备而成（见表 1）[13]，粒径从 1-1000nm 不等，通常包括纳米球和纳米囊两大类，其对材料的具体要求为：（1）性质稳定，容易制备；（2）有合适的释药速度；（3）能与药物结合，且不影响药物的药理作用；（4）生物降解性、相容性好，无毒、无刺激性；（5）具有适宜的理化性质。各种药物一方面可通过吸附、包裹或化学共价结合等方法装载在此纳米粒上，从而避免各种原因引起的过早降解[14]；另一方面通过对纳米粒表面适当的修饰可使载药纳米粒逃

逸体内网状内皮系统（reticuloendothelial system, RES）的摄取，进而实现靶向部位药物浓度的提高[15]。国内外已有大量文献报道并证实利用此新型的聚合物纳米粒药物载体系统输送化疗药治疗脑胶质瘤，将药物靶向入脑，不仅可提高化疗药的效能，且能大大降低化疗药的毒性及不良反应[16]。

表 1 目前常用的聚合物纳米粒制备材料

Material	Full name	Abbreviation or Commercial names*
Synthetic homopolymers	Poly(lactide)	PLA
	Poly(lactide-co-glycolide)	PLGA
	Poly(epsilon-caprolactone)	PCL
	Poly(isobutyrylcyanoacrylate)	PICBA
	Poly(isohexylcyanoacrylate)	PIHCA
	Poly(n-butylcyanoacrylate)	PBCA
	Poly(acrylate) and poly(methacrylate)	Eudragit*
Natural polymers	Chitosan	
	Alginate	
	Gelatin	
	Albumin	
Copolymers	Poly(lactide)-poly(ethylene glycol)	PLA-PEG
	Poly(lactide-co-glycolide)-poly(ethylene glycol)	PLGA-PEG
	Poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene glycol)	PCL-PEG
	Poly(hexadecylcyanoacrylate-co-poly(ethylene glycol) cyanoacrylate)	Poly(HDCA-PEGCA)
Colloid stabilisers	Dextran	F68
	Pluronic F68	PVA
	Poly(vinyl alcohol)	
	Copolymers (see above)	
	Tween® 20 or Tween® 80	

资料来源: Vauthier C, et al. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. Pharm Res. 2009; 26:1025-1058.

氰基丙烯酸烷酯（alkylcyanoacrylate, ACA）是 1955 年由美国 Eastman 公司合成的一类医用胶，外观呈透明无色的低粘度液体，反应活性相对较高，反应过程中常需加入一定稳定剂以维持其稳定，在湿润环境或存在少量碱性物质时 ACA 易发生聚合反应生成聚氰基丙烯酸烷酯（polyalkylcyanoacrylate, PACA）[17]。目前常用的 ACA 单体有氰基丙烯酸甲酯（MCA）、氰基丙烯酸乙酯（ECA）、氰基丙烯酸丁酯（BCA）、氰基丙烯酸异丁酯（IBCA）等。ACA 单体结构式如图 1 所示，常用的聚合反应机制为阴离子聚合，引发剂包括有  $\Gamma^-$ 、 $\text{CH}_3\text{COOH}^-$ 、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{OH}^-$  等[18]，反应过程如图 2 所示。自 1979 年 Couvreur 首次将其用于制备载药纳米粒以来[19]，由于其体内良好靶向性、药物缓释性、生物可降解性、制备简便性、低毒、载药量高、可高压灭菌等优点而备受关注，因此有望成为推向工业化大生产及临床应用的靶向给药载体。

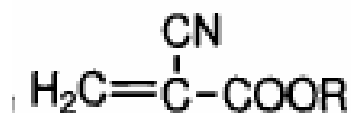


图 1 ACA 单体结构式

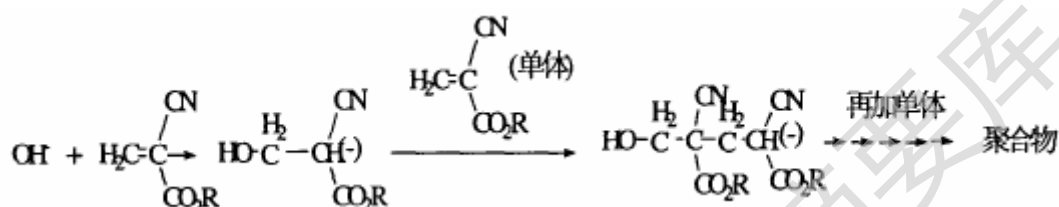


图 2 ACA 单体阴离子聚合反应过程

氰基丙烯酸正丁酯 ( $\alpha$ -butylcyanoacrylate,  $\alpha$ -BCA) 为人工合成高分子材料, 符合药物纳米载体材料的基本要求。聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒 (polybutylcyanoacrylate nanoparticles, PBCA-NP) 是目前少数可通过 BBB 的纳米粒之一, PBCA 与 PACA 家族其他材料相比具备更好的生物相容性及生物体内可降解性, 同时毒性更低[20]。另外由于 PBCA 自身的理化特性, 表面便于改性及共价结合其它基团, 所制备的纳米粒大小均匀, 体内耐受性好, 可显著提高药物的生物利用度, 具备良好的控制释放、靶向投递等功能, 因此备受重视[21]。但是未经表面修饰的 PBCA-NP 由于其本身粒径相对较小, 在体内易被巨噬细胞吞噬而集中分布 RES 丰富的肝、脾、淋巴等部位, 而一旦对该纳米粒表面进行修饰则可显著提高其脑靶向性。

吐温-80 (tween-80, T-80) 是一种非离子表面活性剂, 自 1995 年 Kreuter J[22] 发现利用吐温-80 修饰 PBCA-NP 可显著提高药物进入脑内以来, 至今已有大量研究证实利用此纳米载体系统可使药物脑内浓度大幅度提高, 这些药物包括有: 抗癌药[23]、镇痛药[24]、多肽[22]、NMDA 受体拮抗剂[25]、抗生素[26]和 NSAIDS 药物[27]等。修饰吐温-80 的 PBCA 载药纳米粒靶向入脑的具体机制目前还未完全清楚, 比较公认的观点是该纳米粒子在体内可与载脂蛋白 E、A-I 或 B-100 相偶联结合, 并通过脑毛细血管内皮细胞上受体介导内吞机理进入脑内[28]。

替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 是 80 年代由英国癌症研究运动集团合成

所得，其化学名为 3,4-二氢-3-甲基-4-氧代咪唑并[5,1-d]-1,2,3,5-四嗪-8-酰胺，分子式为  $C_6H_6N_6O_2$ ，分子量 194.15，结构式如图 3 所示，当  $pH < 5$  下稳定， $pH > 7$  时易分解[29]，是目前临床常用的一类抗胶质瘤化疗药，其脂溶性高、血浆蛋白结合率低，相对容易透过血脑屏障，并在脑组织中快速分解产生可使 DNA 甲基化的活性物质，被认为是目前最有效的胶质瘤化疗药物之一，但仍存在一些问题，如脑胶质瘤内聚集浓度低、体内半衰期平均仅 1.8 小时，具有一定的毒性及不良反应，如恶心、呕吐、骨髓抑制、生殖毒性等，因此疗效仍不理想，有必要进一步改进。

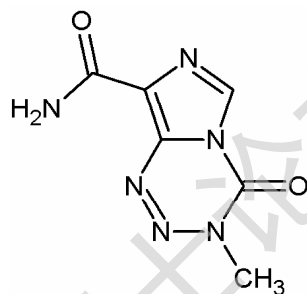


图 3 TMZ 化学结构式示意图

从以上论述中可以看到，替莫唑胺虽然可通过 BBB，但仍具有毒性及较多不良反应，而且半衰期相对较短，在人体血浆中会较快降解而失效。若利用纳米药物载体输送替莫唑胺到脑组织，将有助于提高其溶解度、生物利用度，并使其获得更好的缓释性和靶向性，同时增强抗肿瘤治疗效果，降低毒副作用，改善胶质瘤的治疗现状。因此，研究制备替莫唑胺纳米粒对脑胶质瘤的治疗具有较高的理论价值和实践意义。而 PBCA 是具有良好的生物相容性和生物降解性的高分子材料，用 PBCA 纳米粒包载替莫唑胺，一方面可改善药物的释放性能，实现药物缓释；另一方面可通过对纳米粒进行表面修饰，提高药物的脑靶向性，提高药物脑利用率从而有效降低其全身毒性。因此，载替莫唑胺聚氰基丙烯酸正丁酯的研究将有较高的理论价值和较好的应用前景。

本课题以替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 为模型药物，以生物可降解高分子材料氰基丙烯酸正丁酯 ( $\alpha$ -butylcyanoacrylate,  $\alpha$ -BCA) 为载体，通过对纳米粒处方和工艺的筛选及优化，制备载替莫唑胺聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒

(TMZ-PBCA-NP)，系统研究了 TMZ-PBCA-NP 最佳制备工艺及其理化性质，并考察了修饰吐温-80 对载药纳米粒体外释药行为及体内分布的影响，为替莫唑胺脑靶向制剂的研究提供一定理论和实验依据。

厦门大学博士论文摘要库

# 第一章 载替莫唑胺聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒制备工艺初选研究

## 1.1 引言

纳米粒 (nanoparticles, NP) 是一类以天然或合成高分子材料为载体的固态胶体微粒, 粒径约 1~1000nm, 可作为胶体给药系统, 并具有一定的缓释功能。因此, 将替莫唑胺制备成缓释纳米粒, 通过适当的表面活性修饰提高脑内药物浓度, 可降低不良反应。聚氰基丙烯酸正丁酯 (polybutylcyanoacrylate, PBCA) 为生物可降解高分子材料, 具有良好的生物相容性和缓释性等特点, 已有大量国内外学者研究发现其通过吐温-80 (tween-80, T-80) 修饰后可透过血脑屏障 (blood brain barrier, BBB), 并显著提高脑内药物浓度。

目前, 以氰基丙烯酸正丁酯 (butylcyanoacrylate, BCA) 单体为载体材料制备纳米粒的方法主要有两种: 一种是乳化聚合法[19], 此法是在持续搅拌的含非离子型表面活性剂的酸性水溶液中缓慢滴加 BCA 单体, 单体遇水产生聚合, 从而使药物包封于所形成的纳米粒中或吸附于纳米粒表面。此法操作简便, 适用于水溶性且对酸稳定的药物的制备, 所得的纳米粒为骨架型的纳米球。另一种是界面聚合法[30], 此法是将药物、BCA 及脂肪酸(酯)溶于有机溶剂中组成油相, 将表面活性剂溶于水中形成水相, 在持续搅拌下将油相缓慢滴加入水相中, 在两相的界面 BCA 聚合形成囊。界面聚合法主要适用于脂溶性药物的制备, 所制得的纳米粒为表面包有一层 PBCA 膜, 内呈油核型或水核型的膜核结构的纳米囊。

替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 是一种新型的四嗪类的 DNA 烷化剂, 可迅速通过血脑屏障, 兼具脂溶性及一定水溶性, 是目前用于治疗恶性脑胶质瘤效果较好的化疗药物, 但其半衰期仅 1.8 小时, 口服剂量大, 体内分布呈非特异性, 容易出现恶心、呕吐、疲倦、头痛及骨髓抑制等一些不良反应, 因此临床应用受到一定的限制。

本研究拟采用界面聚合法和乳化聚合法制备替莫唑胺聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒 (TMZ-PBCA-NP), 单因素筛选结合正交试验优化 TMZ-PBCA-NP 的制



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库